

HLA systém, jeho struktura a funkce

***HLA (Human Leukocyte Antigens) =
Hlavní histokompatibilní systém
člověka***

Historie

- ❖ 1930 – 1940- MHC geny nejdříve rozpoznány u myší na základě pokusů s transplantacemi tumorů u myší
- ❖ 60. – 70. léta- již známy 3 lokusy I. třídy HLA-A, -B, -C, MHC geny se účastní v imunitní odpovědi
- ❖ 1972- k produkci protilátek B lymfocyty nutná aktivita T buněk a také účast HLA molekul
- ❖ 1974- fenomén HLA restrikce (T lymfocyty rozpoznávají cizorodý antigen pouze v komplexu s HLA molekulami I. nebo II. třídy
- ❖ 80. léta- objev lokusů II. třídy HLA-DR, -DQ, -DP
- ❖ 90. léta- objev tzv. neklasických antigenů lokusů HLA-E, -F, -G, -H, -J, -K, -X

Struktura HLA systému

- ❖ Nejkomplexnější a nejpolymorfnější systém, každý člověk nese unikátní sestavu HLA alel, výjimka – monozygotní dvojčata
- ❖ lokalizace na krátkém raménku 6. chromozomu (4100 kb, více než 200 genů)
- ❖ geny uspořádány do 3 oblastí: **HLA I., II., III. třída**

HLA I. třída (transplantační, klasické antigeny)

- ❖ I. třída obsahuje geny **HLA –A, -B, -C** pro těžký řetězec α HLA molekuly
- ❖ povrchové glykoproteiny, exprimovány na téměř všech buňkách
- ❖ neklasické geny HLA-E, -F, -G (glykoproteiny - omezený výskyt)
- ❖ pseudogeny

HLA II. třída

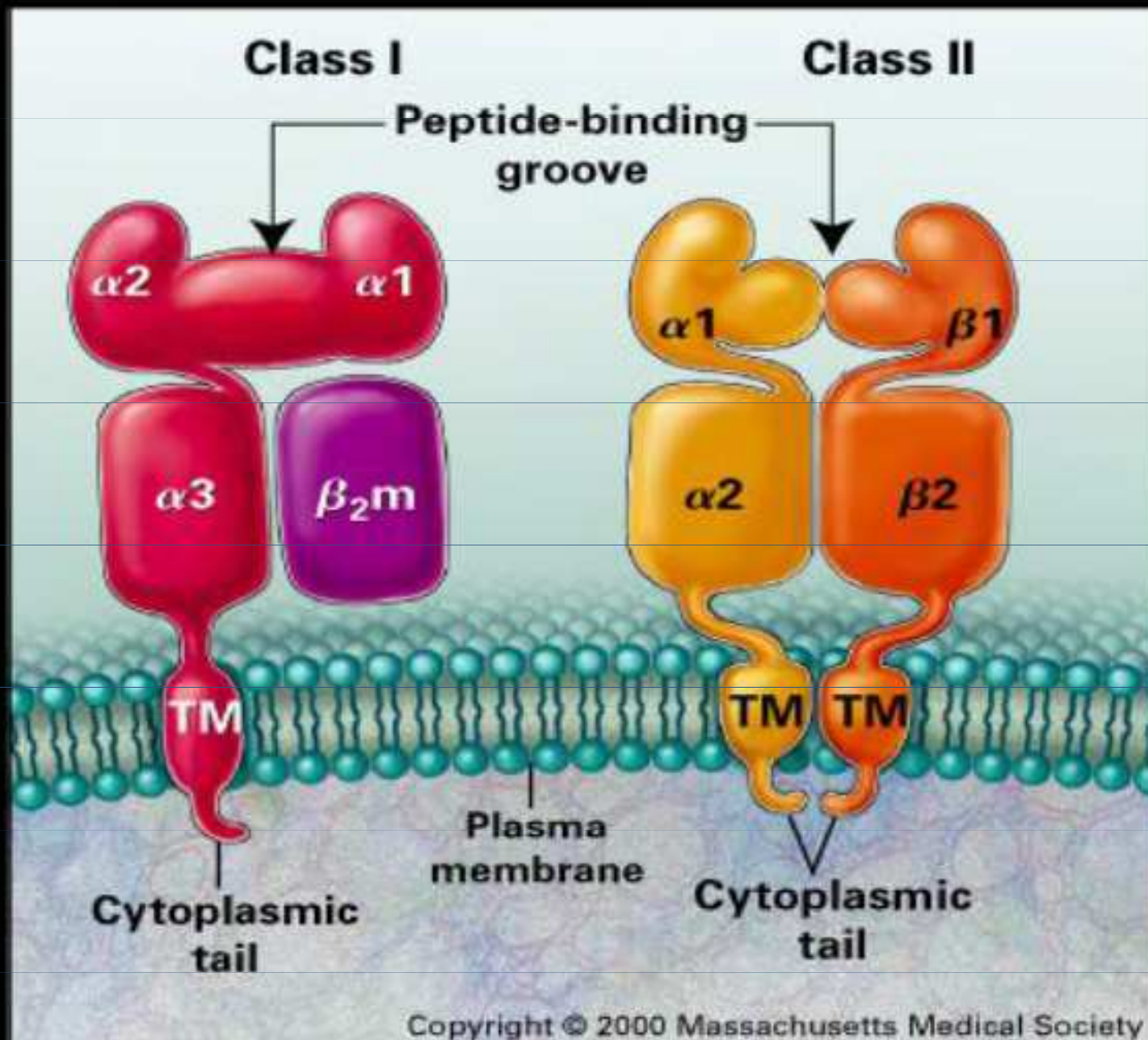
- ❖ geny pro $-\alpha$ a $-\beta$ řetězec HLA molekul – **DR, -DQ, -DP**
- ❖ produkty glykoproteiny exprimovány na povrchu tzv. antigen prezentujících buněk (buňky imunitního systému)
- ❖ **HLA-DM, -DO** geny – produkty výskyt v endozomech, funkce - naložení cizorodého peptidu na HLA molekulu II. třídy)
- ❖ geny **LMP2, LMP7** kódují proteiny, které štěpí cizorodé částice na menší peptidy
- ❖ geny **TAP1, TAP2**, zahrnuty do procesu transportu peptidů do ER

HLA III. třída

- ❖ strukturálně a funkčně odlišné proteiny
- ❖ složky komplement C4, C2, faktor B, 21-hydroxylasa, TNF, heat shock protein Hsp 70

Struktura HLA molekul

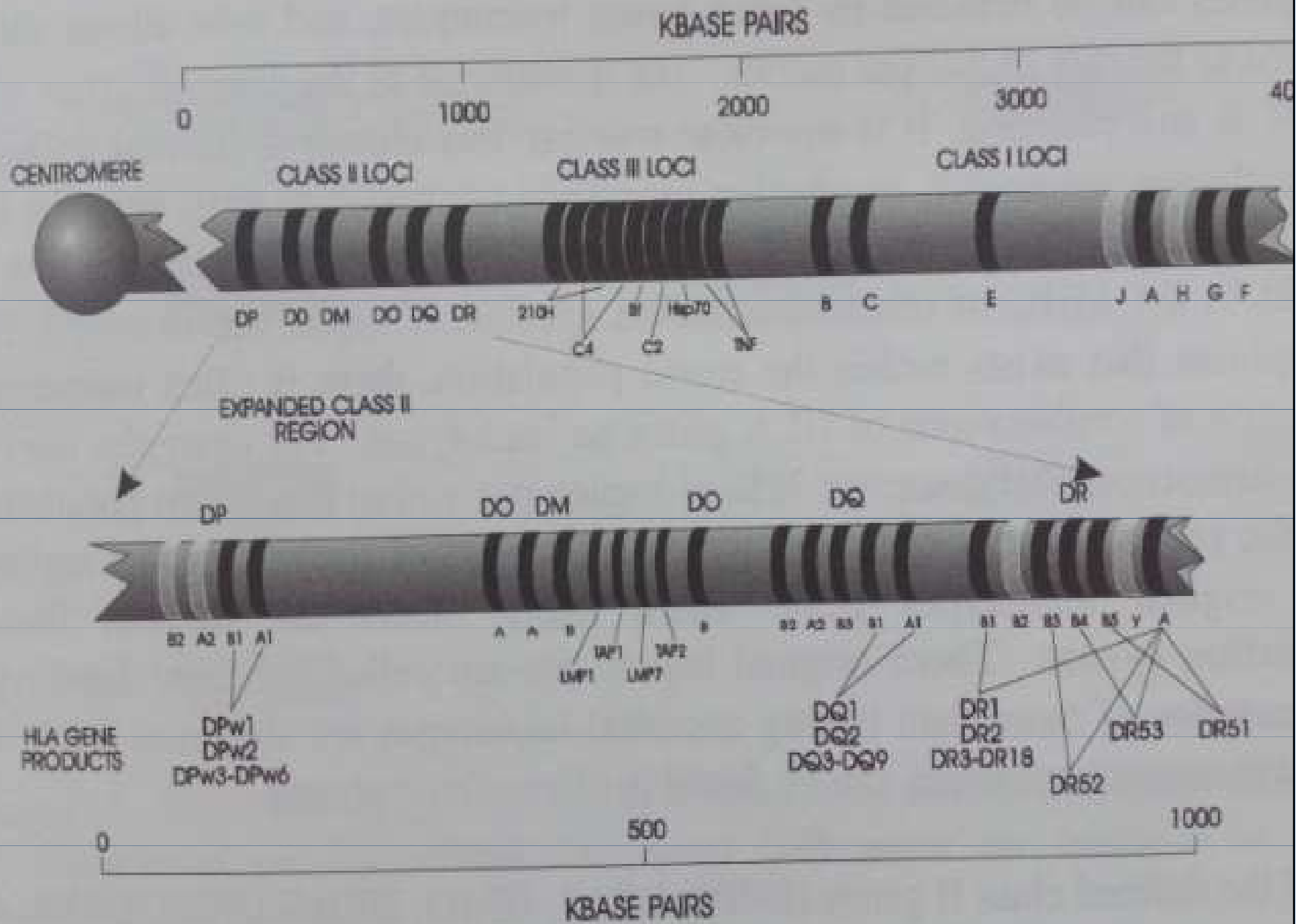
- ❖ HLA molekuly I. a II. třídy jsou glykoproteiny složené ze 2 různých proteinových řetězců (heterodimery)
- ❖ HLA molekuly I. třídy mají těžký α - řetězec nekovalentně vázaný s β 2-mikroglobulinem (gen pro lehký řetězec β 2- mikroglobulin lokalizován na chr. 15)
- ❖ α - řetězec vytváří 3 domény α 1, α 2, α 3
- ❖ α 1 a α 2 vytváří vazebný žlábek pro cizorodý peptid
- ❖ HLA molekuly II. třídy se skládají ze 2 glykoproteinových transmembránových řetězců α , β
- ❖ Každý řetězec je složen do 2 domén - α 1, α 2, β 1, β 2
- ❖ α 1, β 1 vytváří vazebný žlábek pro cizorodý peptid



Klein J, Sato A. The HLA System. First of two parts. N Engl J Med 2000;343:702-9.

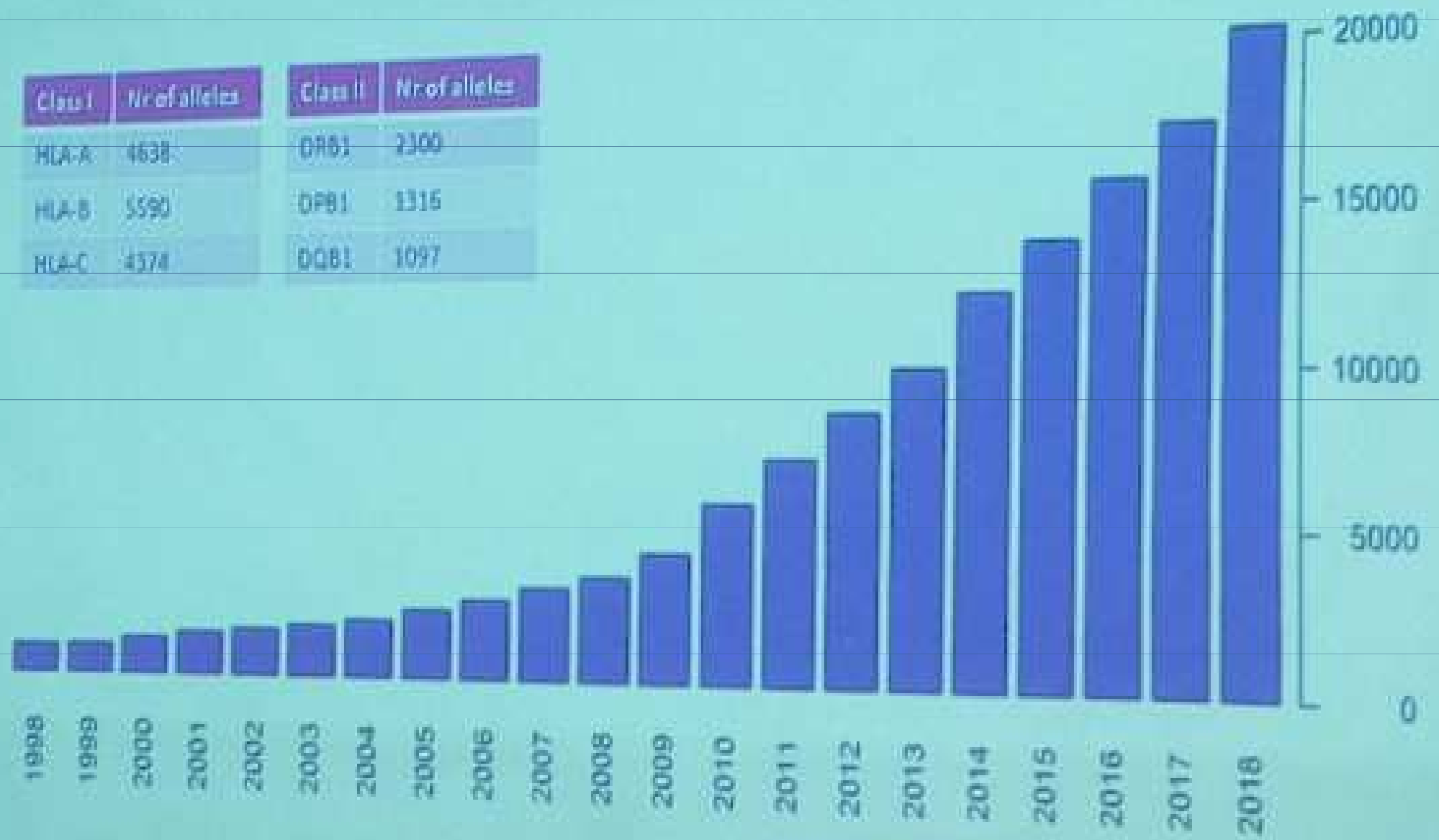


The New England Journal of Medicine



Počet alel stále roste

Class I	Nr of alleles	Class II	Nr of alleles
HLA-A	4638	DRB1	2300
HLA-B	5590	DPB1	1315
HLA-C	4374	DQB1	1097



IPD-IMGT/HLA database

Funkce HLA systému

- ❖ Hlavní funkcí HLA molekul je předkládat (prezentovat) cizorodé antigeny buňkám imunitního systému, především T lymfocytům
- ❖ Tato prezentace antigenu je prvním předpokladem pro rozvoj imunitní reakce a tím obrany proti napadení mikroorganismy
- ❖ imunitní systém musí **rozlišovat mezi „vlastními“ a „cizími“ antigeny**
- ❖ Primární role imunitního systému je rozpoznat a eliminovat nebezpečné cizírode agens
- ❖ fenomén **HLA restrikce** - buněčné receptory T lymfocytů (TCR) rozpoznávají cizorodé peptidy pouze vázané v peptidovém žlábků HLA molekuly I. nebo II. třídy
- ❖ 2 způsoby prezentace antigenů T lymfocytům – endogenní (HLA I. tř.)
- exogenní (HLA II. tř.)

ENDOGENNÍ ZPŮSOB PREZENTACE

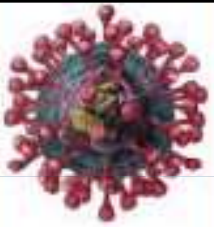
- ❖ HLA molekuly I. třídy
- ❖ rozpoznání a destrukce virem infikovaných bb.
- ❖ proteiny prezentované molekulami HLA I. tř. odvozené od proteinů produkovaných buňkou - **endogenní zdroj**
- ❖ cizorodý peptid + HLA I. tř. → CD8+ (Tc lymfocyty) - zabití napadených buněk

EXOGENNÍ ZPŮSOB PREZENTACE

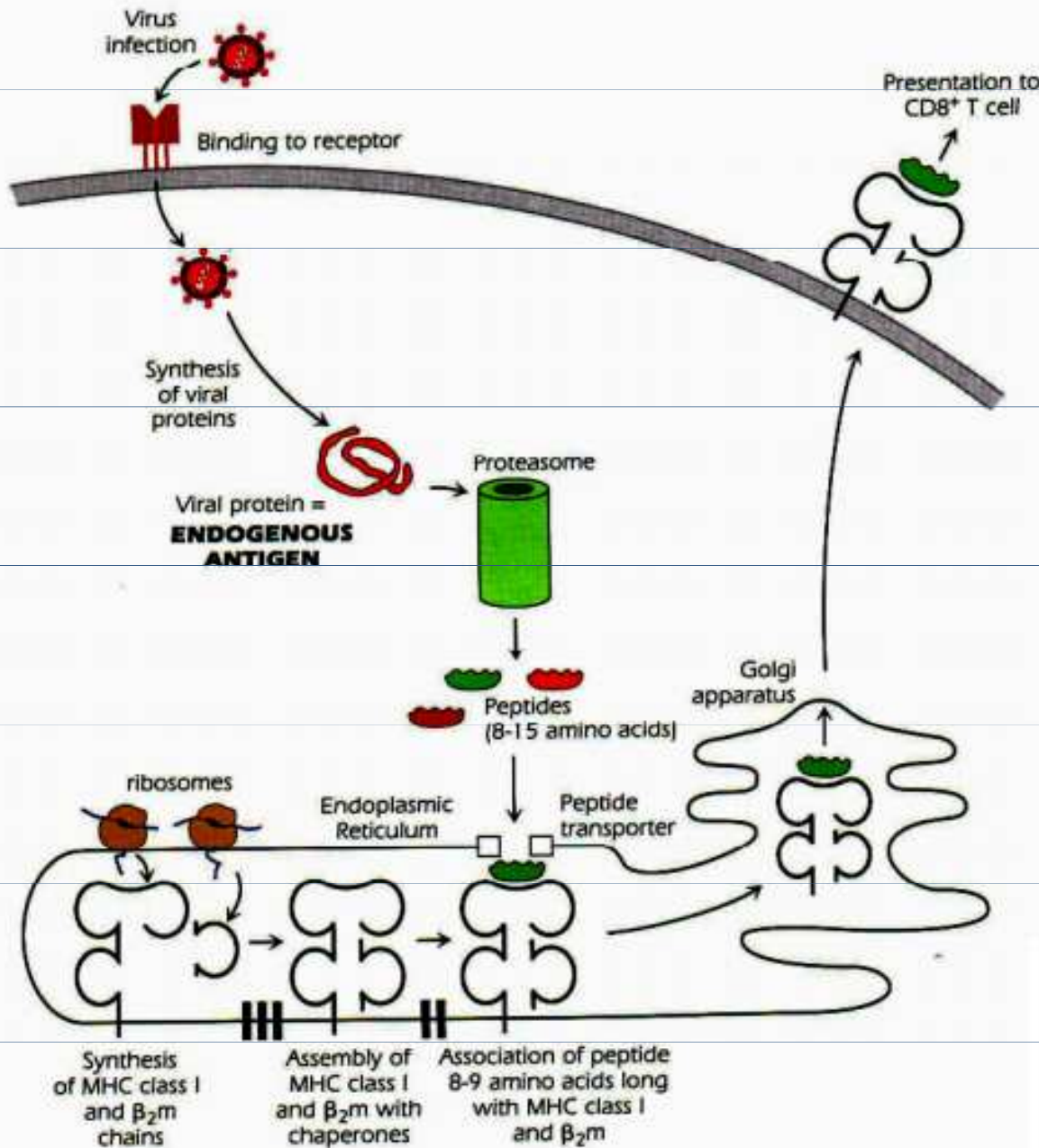
- ❖ HLA molekuly II. třídy
- ❖ vesikulární systém buňky (transportní váček)
- ❖ exogenní antigeny jsou buňkou pohlcené (endocytóza, endozóm) - bakterie, paraziti - **exogenní zdroj**
- ❖ endosom fúzuje s lysosomem (štěpení proteinu)
- ❖ fúze endolysozomu s transportním váčkem s HLA II. molekulami
- ❖ MHC class II loading compartments (MIICs) – naložení peptidu
- ❖ ciz. peptid + HLA II \longrightarrow CD4+ (Th lymfocyty) - aktivace zánětlivé a protilátkové odpovědi

CD4+ Th1 - zánětlivé - aktivace makrofágů k zabití patogenu

CD4+ Th2 - protilátková odpověď, aktivace B buněk k produkci protilátek



Peptidy prezentované pomocí HLA I. tř. – endogenní zdroj



1. Syntéza virových proteinů na ribosomech
2. Ubiquitin – označení proteinu k likvidaci
3. Proteasom – rozštěpení
4. TAP1/TAP2 – transport peptidů do endoplasmatického retikula
5. Naložení na molekulu HLA I a transport na povrch buňky

Peptidy prezentované pomocí HLA II. tř. – exogenní zdroj

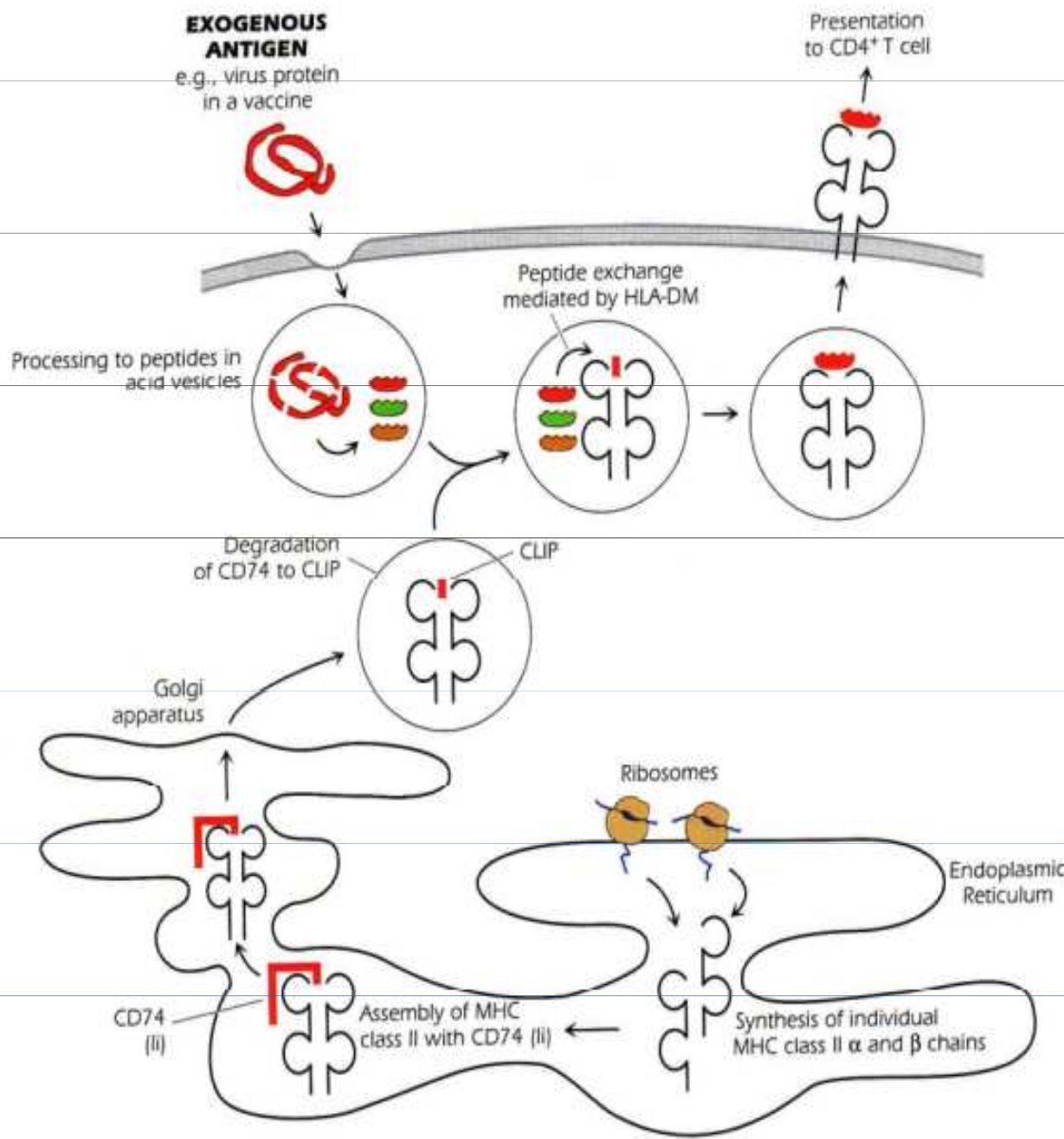
EXOGENNÍ ANTIGEN

Vesikuly s kyselým prostředím
ENDOSOMY
LYSOSOMY - proteolytické štěpení
(katepsiny, endopeptidáza)

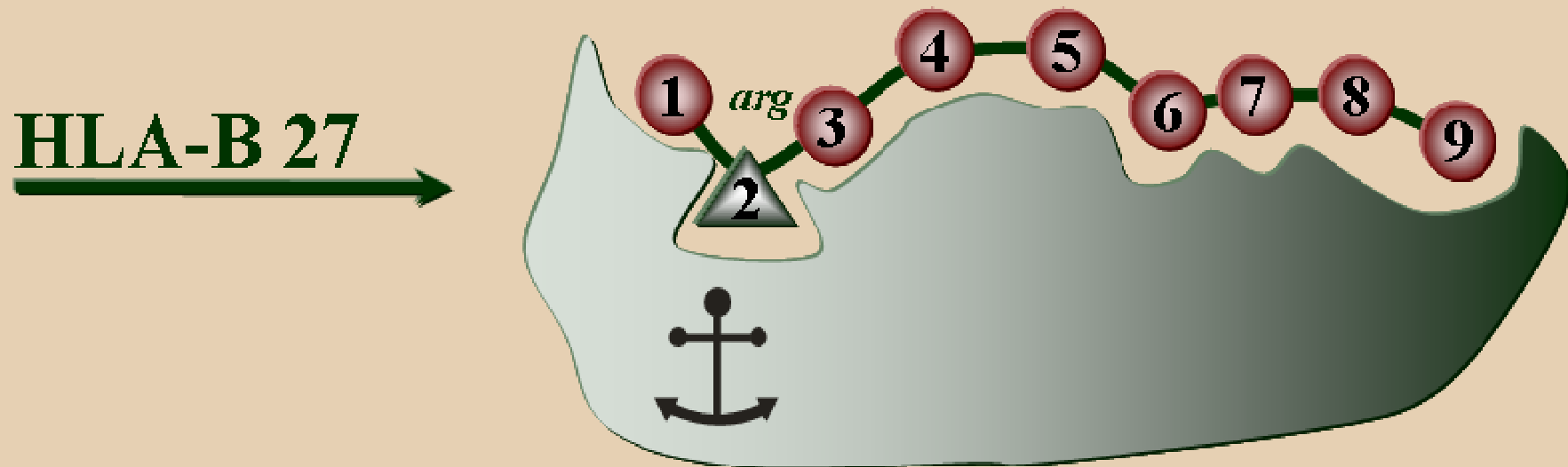
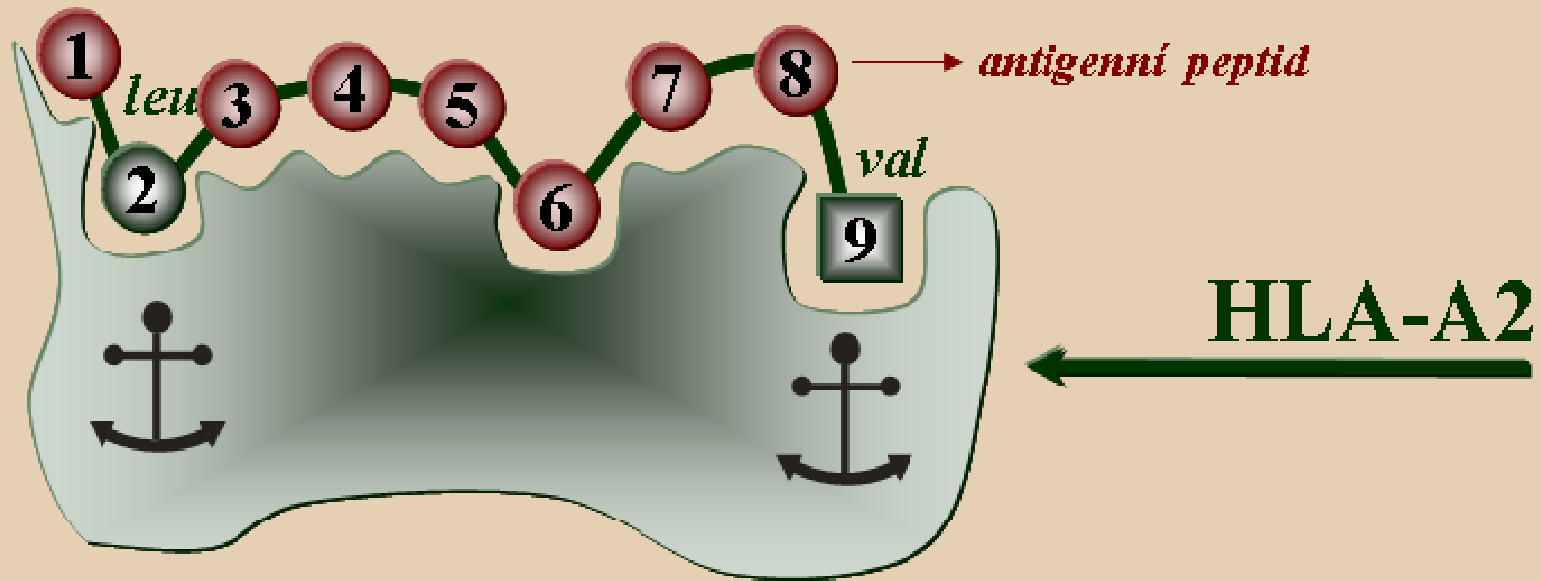
MHC II

ENDOPLASMATICKÉ RETIKULUM

α a β řetězec MHC II + invariantní řetězec (Ii, CD74)
(zabraňuje obsazení vazebných míst vlastními peptidy) \Rightarrow CLIP (CLass II associated Invariant Chain Peptide)
 \Rightarrow HLA-DM \Rightarrow odstranění Ii a záměna za antigenní fragment



VAZBA ANTIGENNÍCH PEPTIDŮ NA MOLEKULY HLA I



HLA molekuly jsou ligandy pro receptory NK buněk

- ❖ NK buňky (přirození zabíječi)
- ❖ NK buňky mají na povrchu **aktivační a inhibiční receptory** (KIR-killer immunoglobuline-like receptor), kterými je regulována aktivita NK buněk
- ❖ Aktivační receptory rozpoznávají běžné povrchové struktury buněk (např. Fc receptor)
- ❖ Inhibiční receptory rozpoznávají HLA molekuly a také neklasické HLA-E a – G molekuly
- ❖ **HLA molekuly aktivují nebo blokuji aktivitu NK buněk**
- ❖ T lymfocyty rozpoznávají přítomnost HLA molekul (vlastní x cizí)
- ❖ NK buňky rozpoznávají absenci HLA molekul na povrchu buňky
- ❖ absence HLA molekul je u normálních buněk vzácná, ale není neobvyklá u některých nádorových b. a u virem infikovaných b.

Ochrana fetálního allograftu

- ❖ Plod v těle matky je z poloviny cizí štěp
- ❖ Klasické HLA produkty I. třídy –A, -B, nejsou exprimovány na buňkách trofoblastu → T lymfocyty jsou k plodu ignorantní
- ❖ na trofoblastu jsou syntetizovány neklasické molekuly HLA-G, (-E) → zajišťují inhibici NK buněk
- ❖ Závěr: Neklasické HLA-G, (-E) molekuly hrají speciální biologickou roli = ochrana vyvíjejícího se fetu před mateřskými T a NK buňkami, hrají roli při potlačení imunitní odpovědi matky proti plodu

úloha HLA molekul v transplantologii

- ❖ HLA molekuly jsou silné aloantigeny indukující rejekci štěpu

Trophoblast

Fetal Side

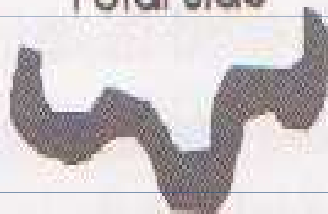


A. Normal HLA Tissue Distribution



T Cell
Activation

Fetal Side



B. No HLA Class I Molecules



NK Cell
Activation

Fetal Side

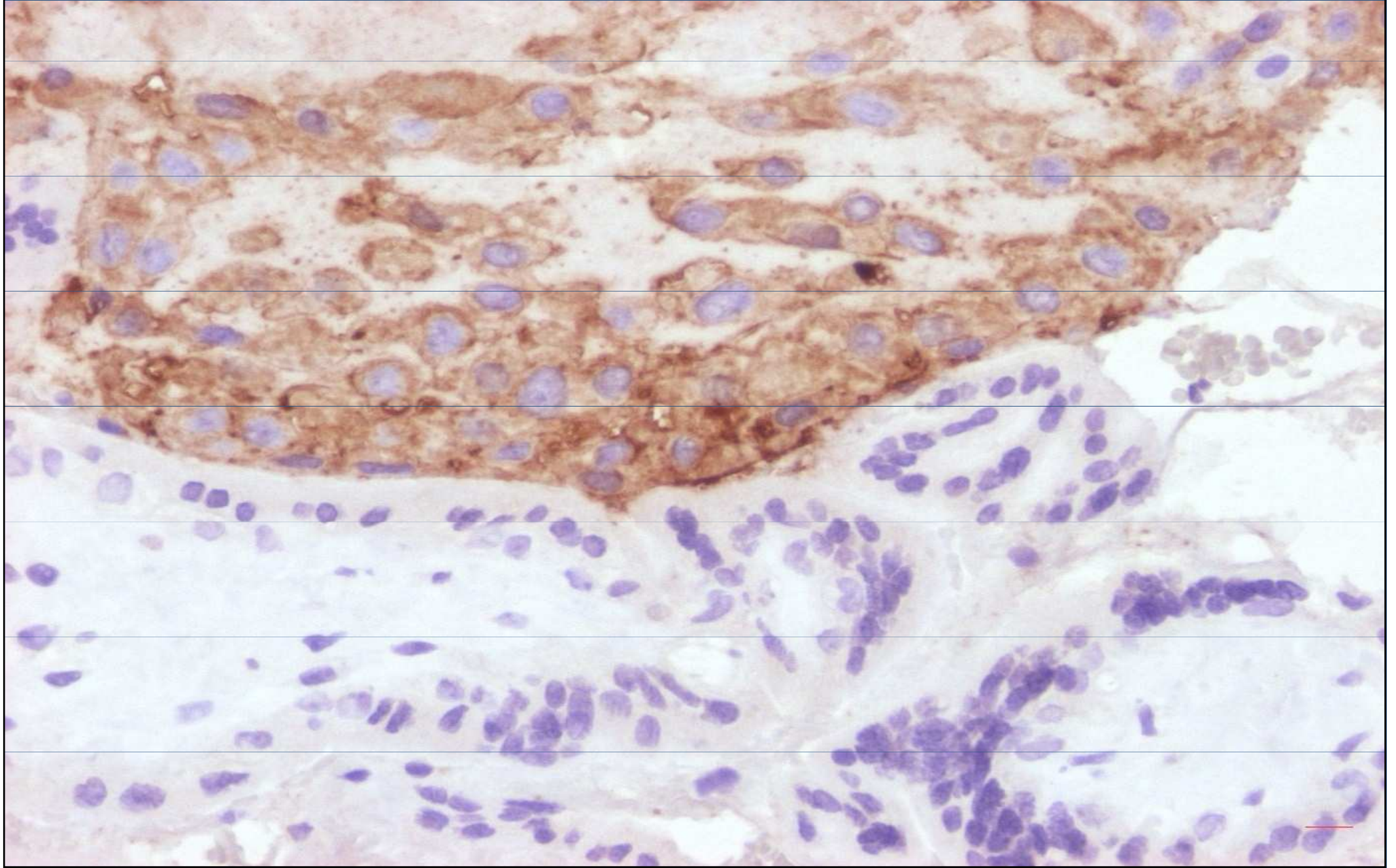


C. Specialized HLA Class I (HLA-E, -G)

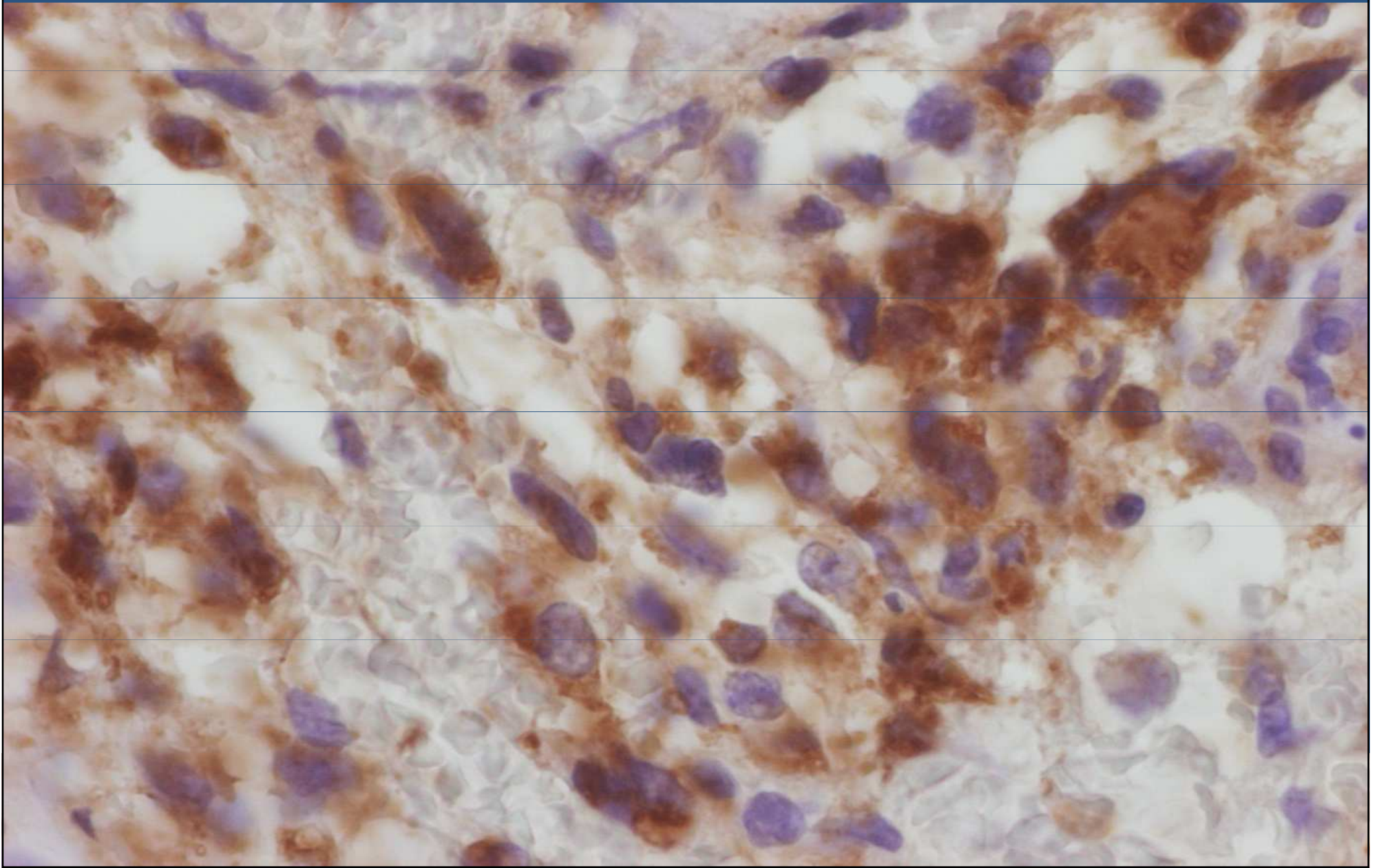


No T or NK Cell
Activation

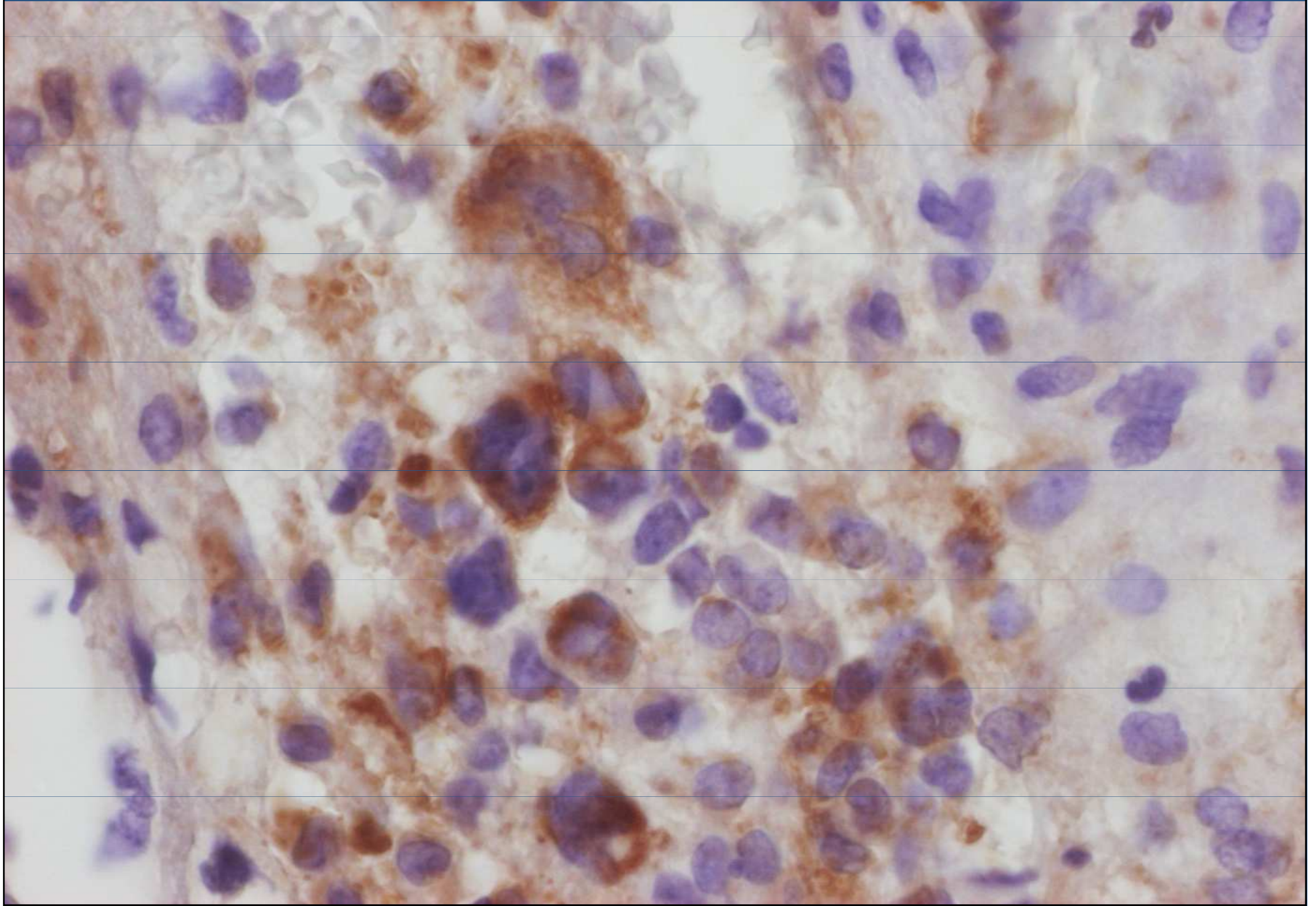
Placental trophoblast cells – HLA – E, G



Glioblastoma neoplastic cells– HLA –E, 400x



Glioblastoma neoplastic cells – HLA –G, 400x



Expresce a distribuce HLA molekul

- ❖ HLA I. tř. - nalezeny na všech jaderných buňkách
- ❖ HLA geny exprimovány kodominantně – obě alely každého HLA lokusu exprimují HLA molekuly
- ❖ na mladých červených krvinkách – atypický antigenní systém **Bga, Bgb, Bgc (reziduální HLA antigeny)**
- ❖ plazma – solubilní HLA antigeny

- ❖ HLA II. tř. – omezená distribuce: B lymfocyty, makrofágy, dendritické buňky, Langherhansovy buňky kůže, (buňky imunitního systému)

- ❖ exprese HLA antigenů I. a II. třídy může být zvýšena během zánětu, ale také může být indukována na určitých buňkách, na kterých se normálně neexprimují (myocyty, hepatocyty).
- ❖ Zvýšená nebo nová exprese HLA antigenů je iniciována cytokiny (interferony)

- ❖ Nová exprese HLA antigenů za určitých podmínek pravděpodobně hraje majoritní roli v patogenezi rejekce transplantovaného štěpu
- ❖ Snížená exprese HLA molekul - nádorové buňky, virem infikované buňky

- ❖ Absence HLA molekul - mechanismus, kterým nádorové buňky a virem infikované buňky obcházejí imunitní rozpoznání T buňkami.

typ buňky, tkáň	exprese	
	HLA I	HLA II
BUŇKY IMUNITNÍHO SYSTÉMU		
dendritické buňky	+++	+
makrofágy	+++	++
T lymfocyty	+++	+
B lymfocyty	+++	+++
JINÉ JADERNÉ BUŇKY		
neutrofilní granulocyty	+++	-
eosinofilní granulocyty	+++	-
epitelové buňky	+++	-
hepatocyty	+	-
nervové buňky	+	-
buňky ledvin	+	-
NEJADERNÉ BUŇKY		
trombocyty	++	-
erytrocyty	-	-

Tab.1.: Odlišnosti v expresi molekul HLA I. a II. třídy na různých buněčných typech
(J. Krejsek a O. Kopecký, Klinická imunologie, str. 125, 2004)

Srovnání vlastností a funkce HLA I a HLA II

Charakteristika	HLA I	HLA II
Struktura	α řetězec + $\beta 2m$	α a β řetězce
Domény	$\alpha 1$, $\alpha 2$ a $\alpha 3$ + $\beta 2m$	$\alpha 1$, $\alpha 2$ a $\beta 1$, $\beta 2$
Buněčná exprese	téměř všechny jad.buňky	APC (B buňky, dendritické buňky, makrofágy)
Peptidy vazací místo	uzavřené, váže 8-9 amk tvořené doménami $\alpha 1$ a $\alpha 2$	otevřené, váže 12-17amk tvořené doménami $\alpha 1$ a $\beta 1$
Peptidy	endogenní antigeny	exogenní antigeny
Peptidy prezentované	CD8+T buňkám	CD4+T buňkám

Dědičnost HLA systému

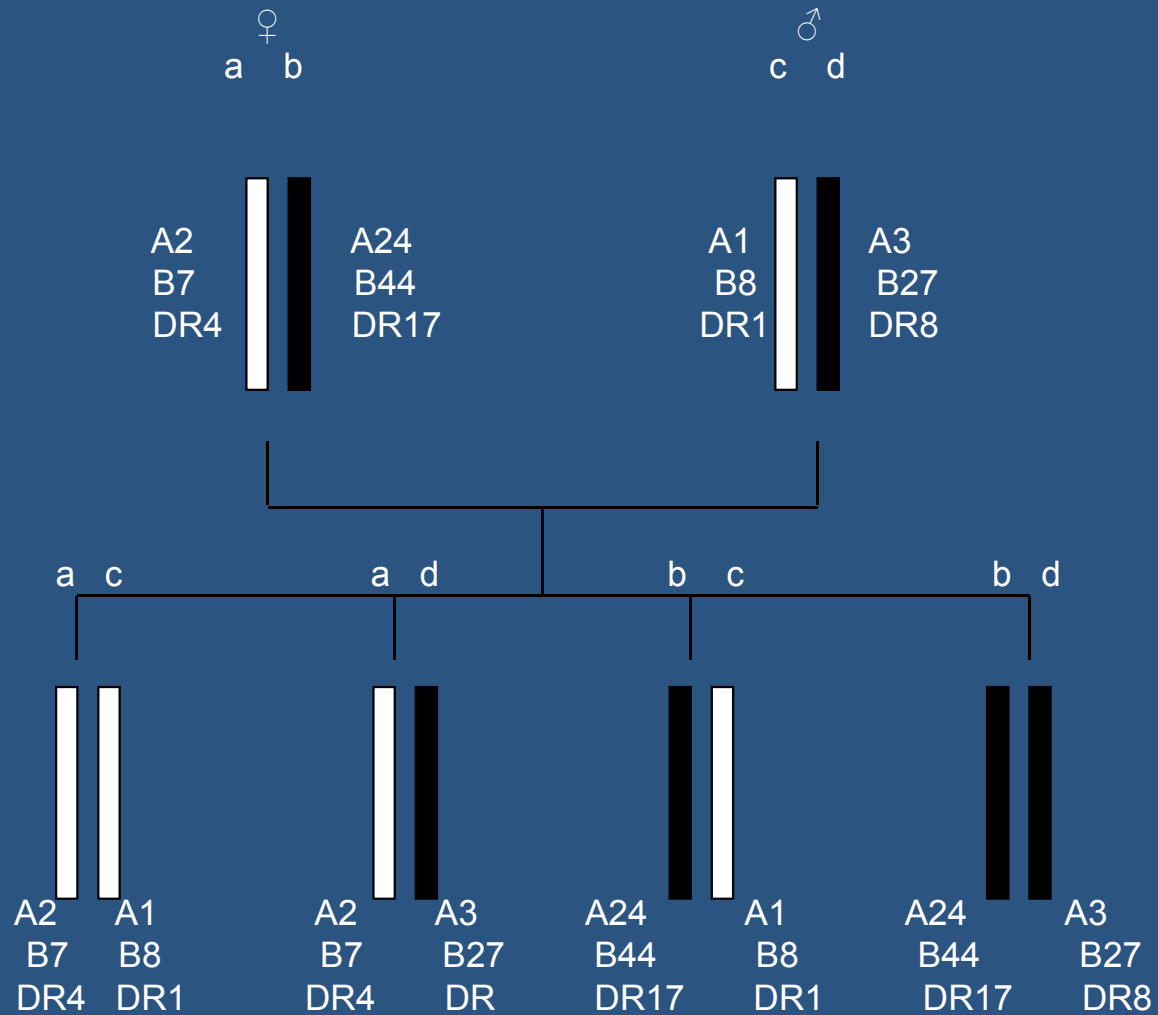
- ❖ geny vázané X geny volně kombinovatelné
- ❖ HLA geny jsou vázané → děděny „en bloc“ od rodičů jako haplotyp
- ❖ někdy rekombinace v HLA oblasti (crossing-over během meiotického dělení) → výměna genetického materiálu mezi homologickými chromozómy → vznikají rekombinantní sestavy alel
- ❖ frekvence rekombinace je závislá na vzdálenosti mezi geny
- ❖ vazebná nerovnováha (linkage disequilibrium)
 - běžná v HLA systému
 - určité kombinace alel se vyskytují častěji, než by se očekávalo na základě genových frekvencí
- ❖ evoluční základ vazebné nerovnováhy je spekulativní, určité kombinace HLA alel asi poskytují v některých populacích určitou selekční výhodu

Např. **HLA-A1** a **HLA-B8** s genovými frekvencemi **0,16** a **0,1** v populaci. Očekávaná frekvence výskytu haplotypu **HLA –A1, B8** v populaci by měla být **$0,16 \times 0,1 \times 100\% = 1,6\%$** . V některých kavkazských populacích frekvence tohoto haplotypu zdaleka přesahuje očekávanou frekvenci (**8%**)

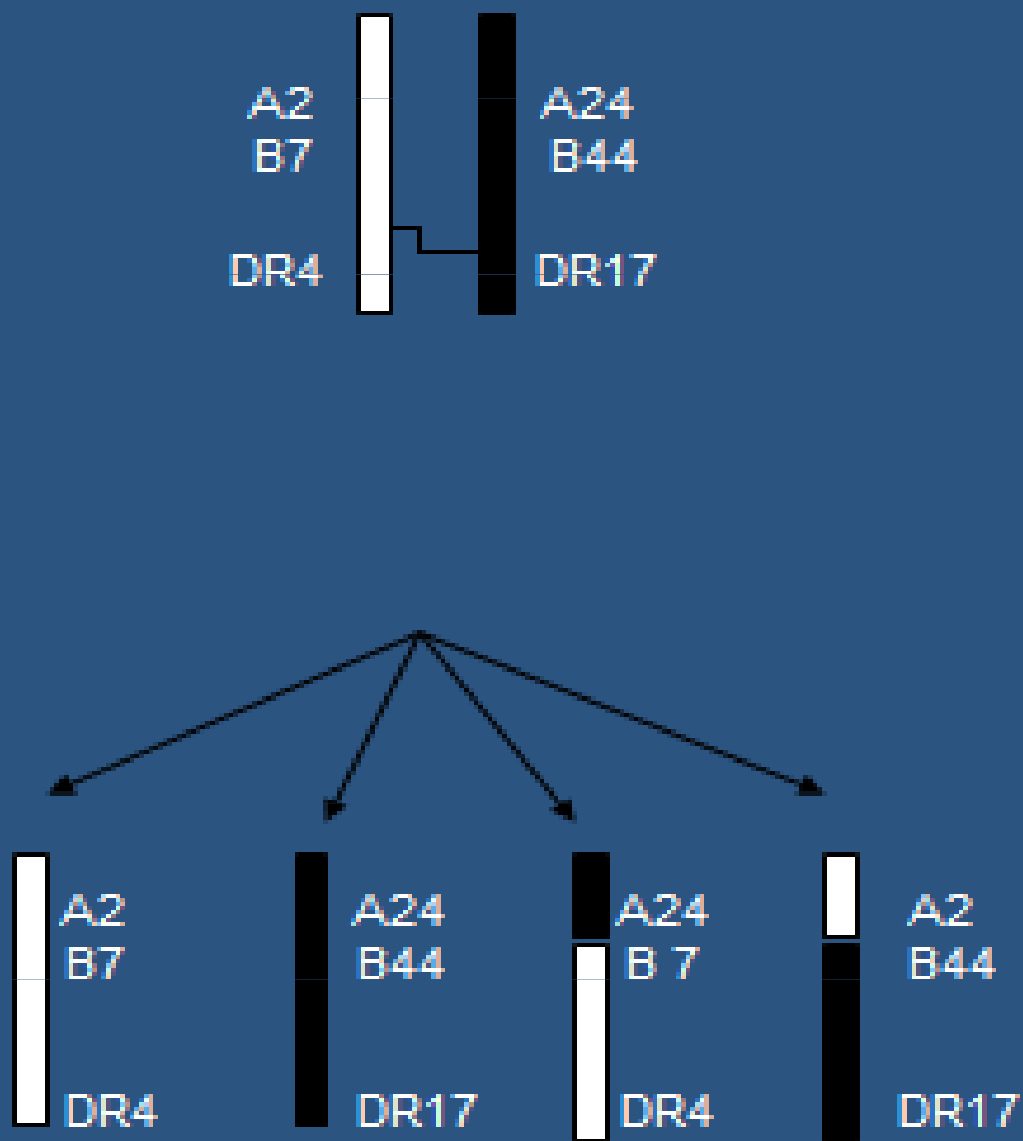
Nejčastější haplotypy v různých etnických skupinách

	<u>African</u>	<u>Asian</u>	<u>Caucasian</u>
	Haplotype (freq.%)		
1.	A30,B42,DR3 (1,67)	A33,B58,DR3 (1,58)	A1,B8,DR3 (5,18)
2.	A1,B8,DR3 (1,25)	A33,B44,DR6 (1,46)	A3,B7,DR2 (2,63)
3.	A3,B7,DR2 (0,76)	A24,B52,DR2 (1,38)	A2,B44,DR4 (2,15)
4.	A2,B44,DR4 (0,65)	A2,B46,DR9 (1,35)	A2,B7,DR2 (1,8)
5.	A33,B53,DR8 (0,63)	A33,B47,DR7 (1,34)	A29,B44,DR7 (1,47)

Dědičnost HLA haplotypů



Vznik nerekombinantních a rekombinantních HLA haplotypů



HLA asociovaná onemocnění

- ❖ 1967 – první zprávy o asociaci HLA systému s onemocněním u člověka
- ❖ 1973 – objevena asociace **HLA-B27 s ankylozující spondylitidou** (m. Bechtěrev)
- ❖ následně byly studovány stovky onemocnění pro možnou asociaci onemocnění s HLA systémem
- ❖ u více než 50-ti onemocnění byla prokázána statisticky významná HLA asociace
- ❖ HLA asociované choroby jsou nemaligní chronická onemocnění
- ❖ převážně autoimunitní onemocnění
- ❖ většina chorob je multifaktoriálních (geny+ environmentální složka)
- ❖ spouštěčem často environmentálním faktory (mikroorganismy, stres)

Některé příklady asociace HLA alel s chorobou:

Birdshot retinopathy	-A29	RR=200
Ankylosing spondylitis	-B27	81,8
Narcolepsy	-DQB1*06:02	100
Psoriasis vulgaris	-B13, Cw6	4,5 7,2
Celiac disease	- DQB1*02, *03:02 DQA1*03:01, *05	13,3
Type I diabetes mellitus	-DQB1*02, *03:02 DQA1*03:01, *05	10
Multiple sclerosis	-DR2, -DQ6	4
Rheumatoid arthritis	-DR4	4

ANKYLOSING SPONDYLITIS (AS, M. BECHTĚREV)

- ❖ Asociace s HLA-B27
- ❖ zánětlivá forma artritidy, postižení ve větší míře mladí muži
- ❖ postižení začíná obvykle v dolní části páteře, kde zánět napadá kloubní spojení mezi pánevní a páteří, nemoc se může postupně šířit nahoru a dolů ke kyčelním a kolenním kloubům.
- ❖ různý průběh onemocnění, může končit velmi vážnými deformitami
- ❖ průběh onemocnění dlouhodobý
- ❖ ostatní choroby asociované s HLA-B27 – Reiterova choroba (revmatické onem., často vyvolávají chlamydie, trojice obtíží: neinf.zánět kloubů, moč.trubice a spojivek)
- ❖ Anterior uveitis (přední uveitida-zánět duhovky, řasnatého tělíska)

TYPE I DIABETES MELLITUS (IDDM)

- ❖ silná asociace s DQA1*05:01/DQB1*02:01 a DQA1*03:01/DQB1*03:02 v kavkazské populaci
DQA1*05:01/DQB1*02:01 u amerických černochoů
DQA1*05:01/DQB1*03:02, DQA1*03:01/DQB1*04:01, DQA1*03:01/DQB1*03:03 u Japonců
- ❖ protektivní účinek vůči IDDM je asociován s DQB1*06:02 (DQA1*01:02/DQB1*06:02)
- ❖ IDDM se vyvíjí postupně, dlouhá subklinická etapa spojená s postupujícím poškozením beta buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu, které tvoří inzulin, klinický projev – zničeno asi 90% buněk
- ❖ za rozvoj onemocnění zodpovědno více faktorů – geny a negenetická složka (infekce enteroviry = polioviry, coxsackieviry A, B, echoviry)
- ❖ většina nákaz virem je asymptomatická

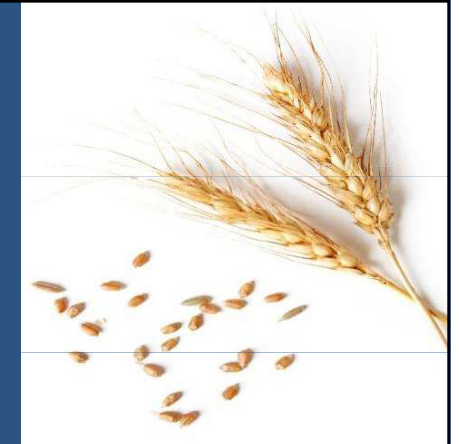
CELIAC DISEASE (CD)

-predispoziční haplotypy

-DRB1*03- DQA1*05:01- DQB1*02:01

-DRB1*07- DQA1*02:01- DQB1*02:02

-DRB1*04 -DQA1*03:01-DQB1*03:02



- ❖ geneticky podmíněné autoimunitní onemocnění
- ❖ intolerance na gluten (lepek), trávicí soustava pacienta není schopna trávit potraviny obsahující lepek
- ❖ chronický zánět sliznice tenkého střeva, prevalence v ČR 1 : 200-250 obyv.
- ❖ pro vývoj onemocnění nutné 3 podmínky:
 1. genetické předpoklady
 2. konzumace stravy obsahující lepek
 3. spouštěč onemocnění (stres, trauma, virová infekce)
- ❖ dlouhodobé průjemy, únava, bolesti kostí, břicha, svalů, u dětí také problémy se zuby, růstem a vývojem
- ❖ jediná známá léčba – celoživotní dodržování bezlepkové diety

MULTIPLE SCLEROSIS (MS)

- ❖ slabší asociace s HLA alelami DRB1*15:01, DQB1*06:02 a DQA1*01:02
- ❖ vliv faktory genetické i negenetické (vliv prostředí, neznámé imunologické procesy)
- ❖ chronické zánětlivé demyelinizující onemocnění centrálného nervového systému s nejasnou etiologií a patogenezi

NARKOLEPSIE

- ❖ neurologické **onemocnění**, v ČR 2500-5000 osob
- ❖ hypersomie – zvýšená denní spavost někdy doprovázená kataplexií (ochabnutí kosterního svalstva)
- ❖ pravděpodobně autoimunitní onemocnění s dědičným sklonem nastartované vnějším faktorem (streptokoková infekce) namířené proti hypocretinovým neuronům, které mají budivou funkci

HLA nomenklatura

1. Serologická definice HLA antigenů – maximálně 2 znaky

- ❖ antigeny základní – např. **A9, A10, B51, B40, Cw3, DR2, DQ3....**
- ❖ antigeny splitové (subtypy) - sdílejí společné sérologicky definované epitopy

např. **A10** → **A25, 26, 34**

B40 → **B60, 61**

Cw3 → **Cw9, 10**

DR2 → **DR15, 16**

DQ3 → **DQ7, 8, 9**

- ❖ antigeny obecné – **DR51, DR52, DR53**

V r. 1987 – 10th International Histocompatibility Workshop, přijata nomenklatura založená na následujících principech:

- ❖ **HLA**= Hlavní histokompatibilní komplex člověka
- ❖ **A, B, C, DR, DQ, DP.....** lokusy
- ❖ **číslo (A1, Cw3)** = označení specifity molekuly (antigenu)

2. Molekulárně-genetická definice HLA alel

❖ používá znaky dvou a vícemístné

př. **HLA-A*02, *31, B*08, *44, C*02, *12, DRB1*04, *13, DQB1*07, *08**

- úroveň „**low resolution**“

HLA-A*01:01, *02:02, B*07:01, *35:01, C*02:02, *03:03, DRB1*04:01, *13:05, DQB1*03:04, *03:05

- úroveň „**high resolution**“

❖ Někdy více jak 4 znaky:

C*02:02:01, *02:02:02.....alely se liší v tiché nukleotidové substituci na úrovni DNA, ne v aminokyselinové sekvenci na úrovni polypeptidu (tichá mutace)

A*24:02:01:01 7. a 8. pozice – polymorfismus v nekódující oblasti

A*24:02:01:02L „**low expressed**“ allele

B*51:11N „**null**“ allele

Duben 2010 – nová nomenklatura, k oddělování jednotlivých dvojčíslí v označení alel se budou používat dvojtečky.

Např.: **B*0808N**→**B*08:08N**

A*9201→**A*02:101**

Polymorfismus genů HLA I. a II. třídy (www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html)

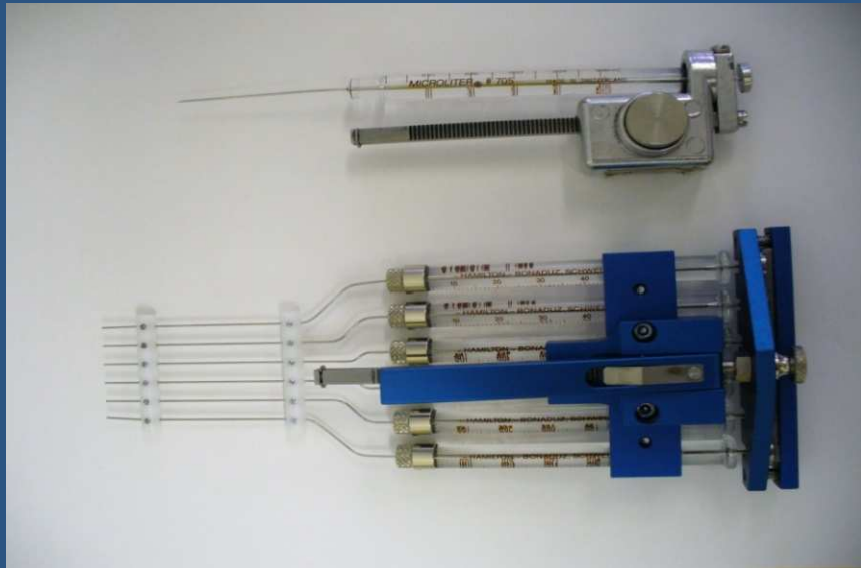
HLA I. třídy		HLA II. třídy	
lokus	počet alel	lokus	počet alel
HLA-A	893	HLA-DRB	814
HLA-B	1431	HLA-DRA	3
HLA-C	569	HLA-DPB1	136
HLA-E	9	HLA-DPA1	28
HLA-F	21	HLA-DQB1	106
HLA-G	45	HLA-DQA1	35

Metody typizace HLA antigenů

1. serologické metody

Complement –Dependent Cytotoxicity Assay (CDC) = Lymfocytotoxický test (LCT)

- ❖ lymfocyty typovaného jedince jsou nejdříve inkubovány se specifickými antiséry, která jsou rozkapána na mikrotitračních plotnách
- ❖ přidáno králičí sérum jako zdroj komplementu
- ❖ vazba protilátky se specifickým HLA antigenem na membráně lymfocytu aktivuje komplement, který poškozují buněčnou membránu
- ❖ vitální barvení (trypanová modř, eosin), mrtvé buňky se obarví
- ❖ mikroskopické hodnocení, hodnotí se procento obarvených (mrtvých) buněk, síla reakce -, 2, 4, 6, 8
- ❖ nehodnotitelný výsledek - 0

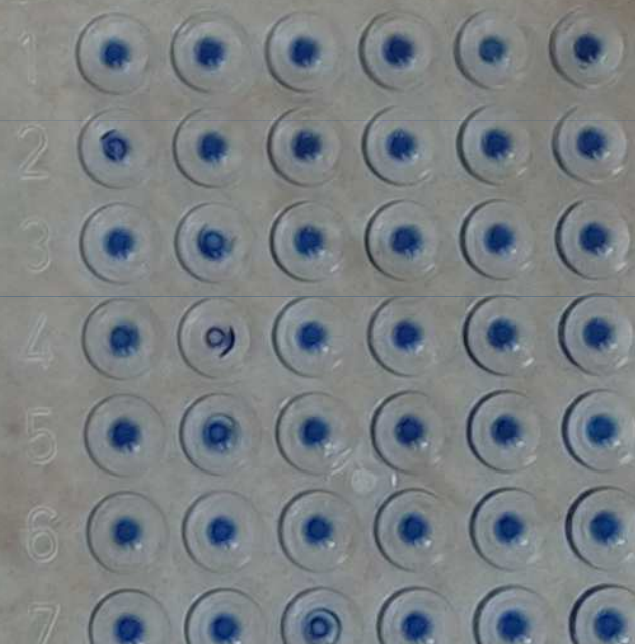
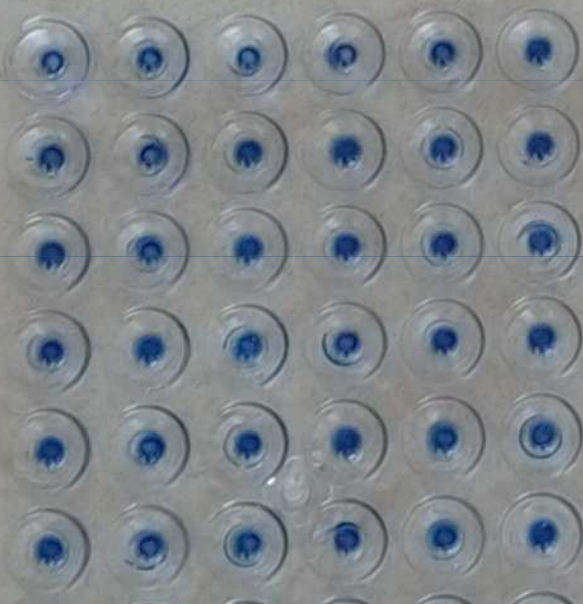




S2505/15



S2505/15



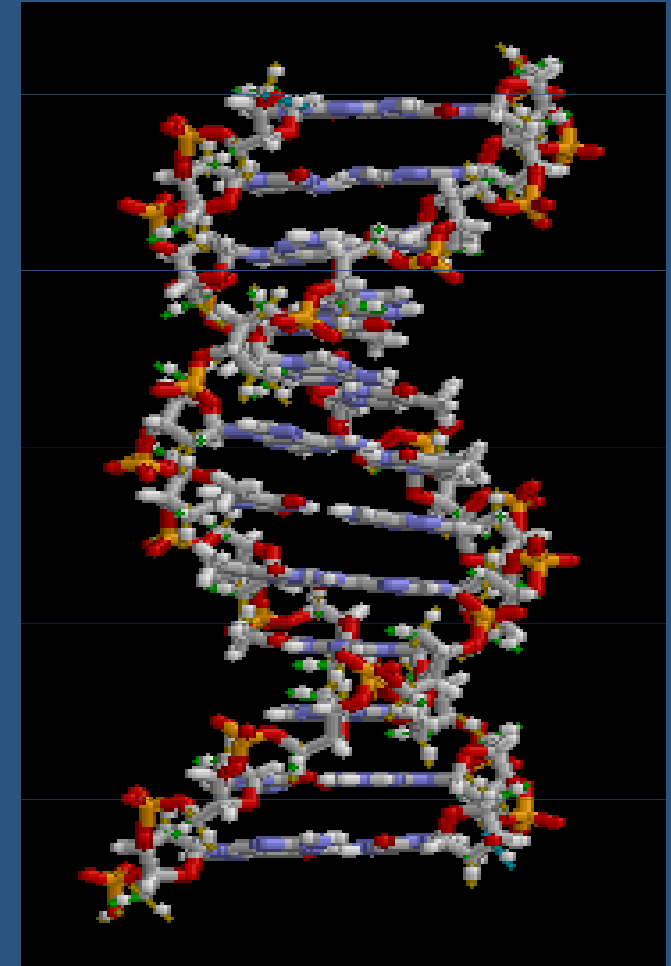
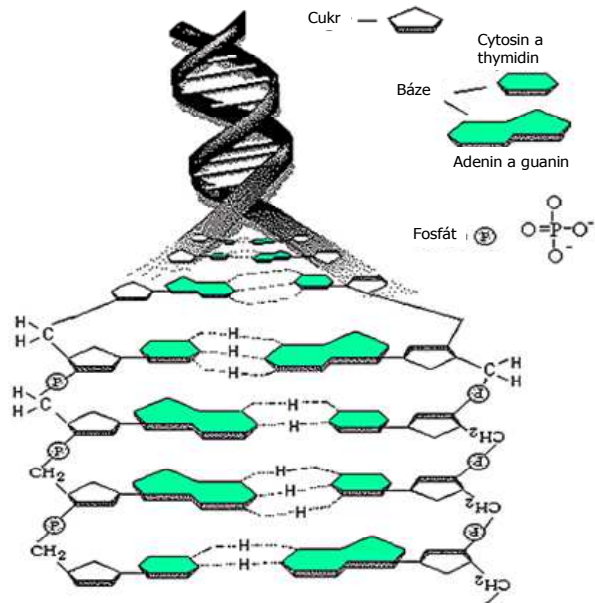
2. molekulárně-genetické metody

PCR – enzymatická metoda in vitro, která slouží k namnožení (amplifikaci) specifického úseku DNA vymezeného párem specifických primerů.

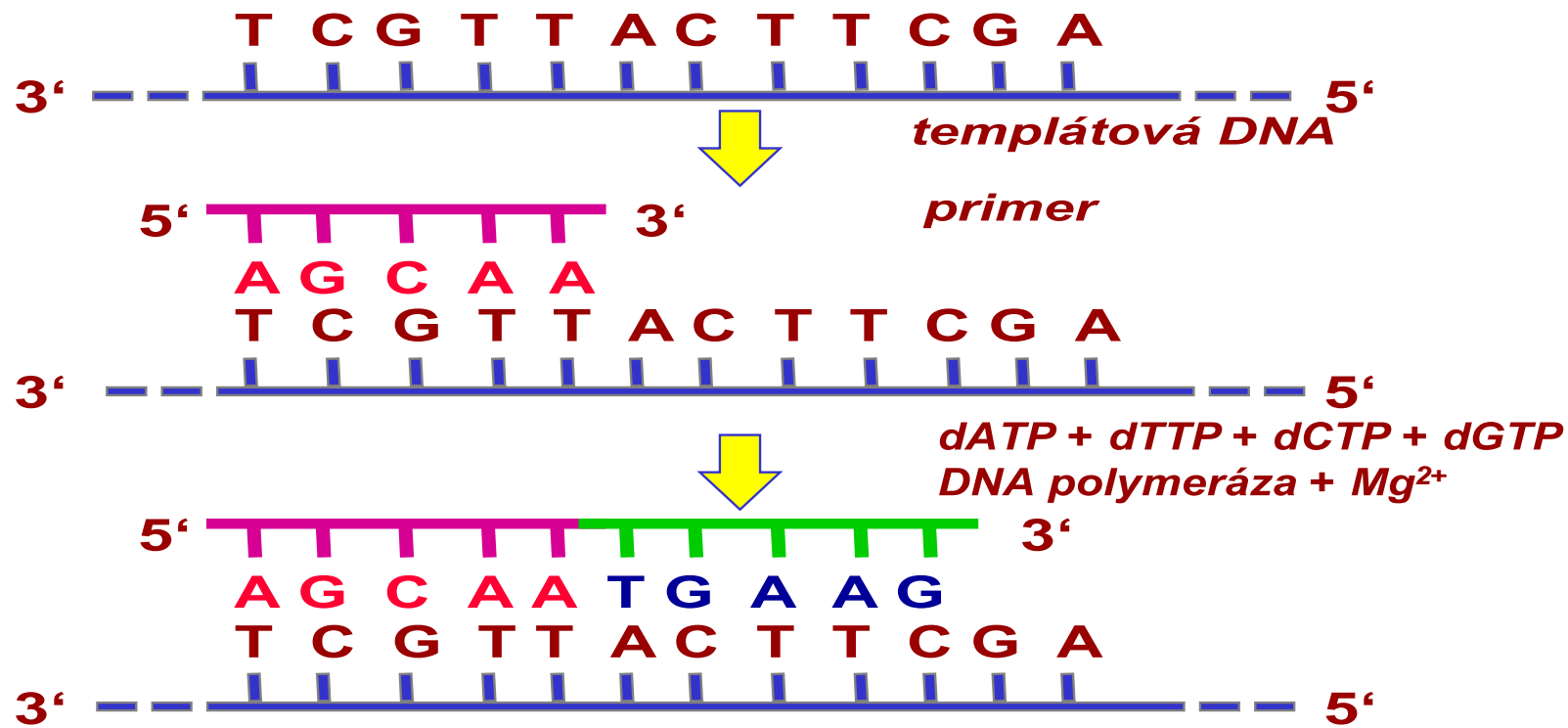
3 kroky – **izolace DNA** (plná krev, buňky stěry, krevní skvrny, vlasové folikuly, parafínové tkáňové bloky)

- amplifikace DNA (PCR)
- detekce PCR produktu

Počet kopií DNA - 2^n
n – počet cyklů (30 – 35)



PCR - *elongace primerů*



HLA typizace pomocí PCR metod

PCR – SSP(sequence – specific priming)

PCR – SSO (sequence – specific oligonukleotide probes)

PCR – SBT (sequence based typing)

Real-Time PCR

NGS – sekvenování nové generace

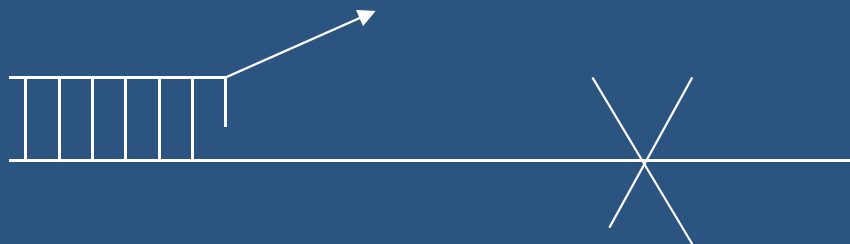
1. PCR – SSP

- ❖ jednotlivé páry primerů určují jednu alelu nebo skupinu alel (alelově a skupinově specifické primery), rozlišení během PCR
- ❖ tolik primerových párů, aby mohly být amplifikovány a detekovány všechny známé alely daného lokusu
- ❖ PCR – SSP může být užita pro „low resolution“ nebo „high resolution“
- ❖ HLA typizace „low resolution“ pro lokusy -A, -B, -DR, -DQ vyžaduje 95 – 100 primerových párů
- ❖ v každé zkumavce tzv. interní kontrola amplifikace
- ❖ kontrola kontaminace – zkumavka obsahuje všechny reagenty pro PCR kromě templátové DNA
- ❖ Detekce elektroforeticky, amplikony s menší molekulovou hmotností migrují v gelu rychleji než amplikony s vyšší molekulovou hmotností
- ❖ vizualizace – obarvení gelu fluorescenční barvou, která se inkorporuje do DNA, expozice gelu UV světlem na transiluminátoru
- ❖ fotodokumentace

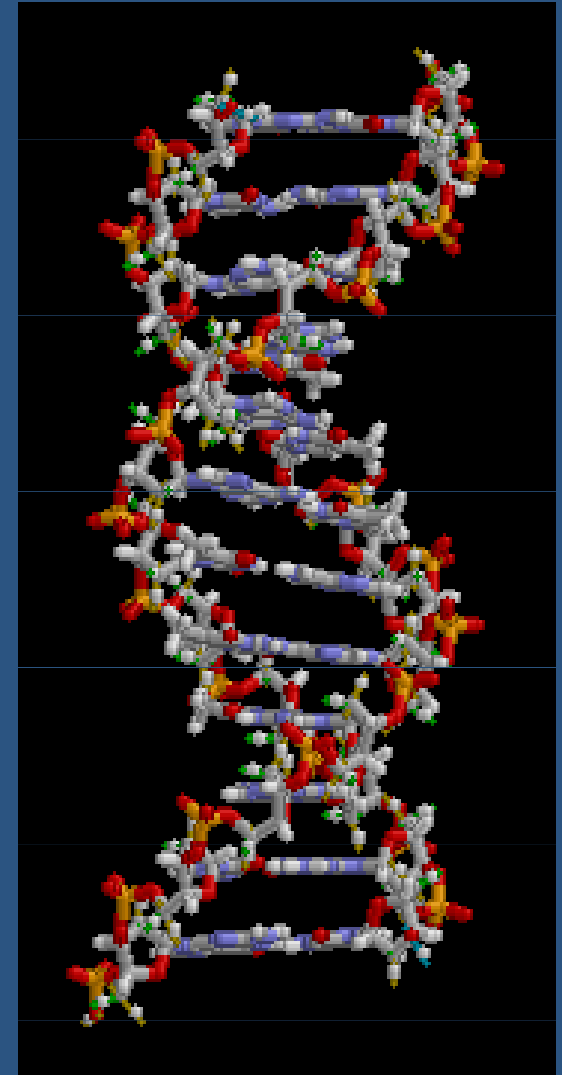
Princip SSP-PCR

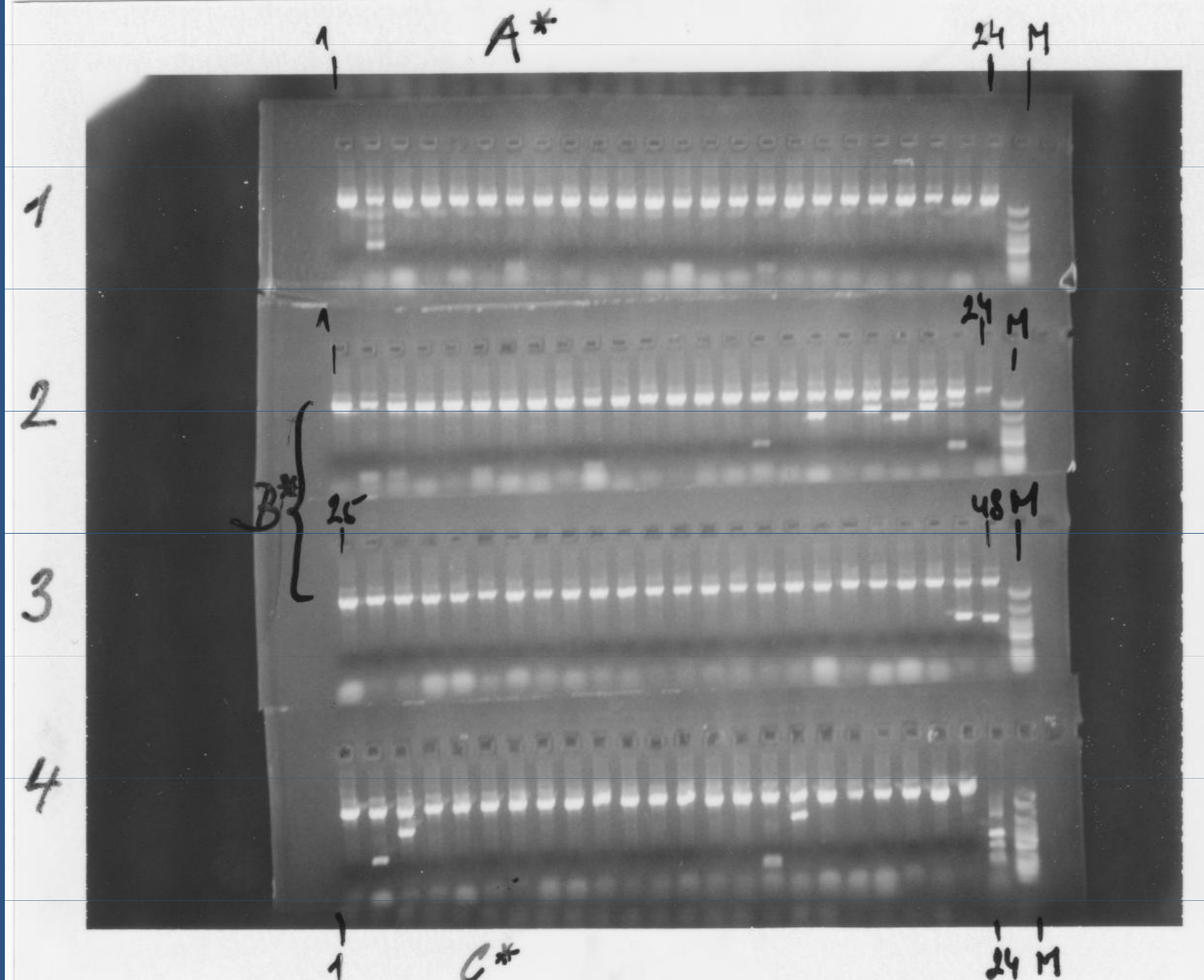


úplná shoda – amplifikace proběhne



neshoda – amplifikace neproběhne

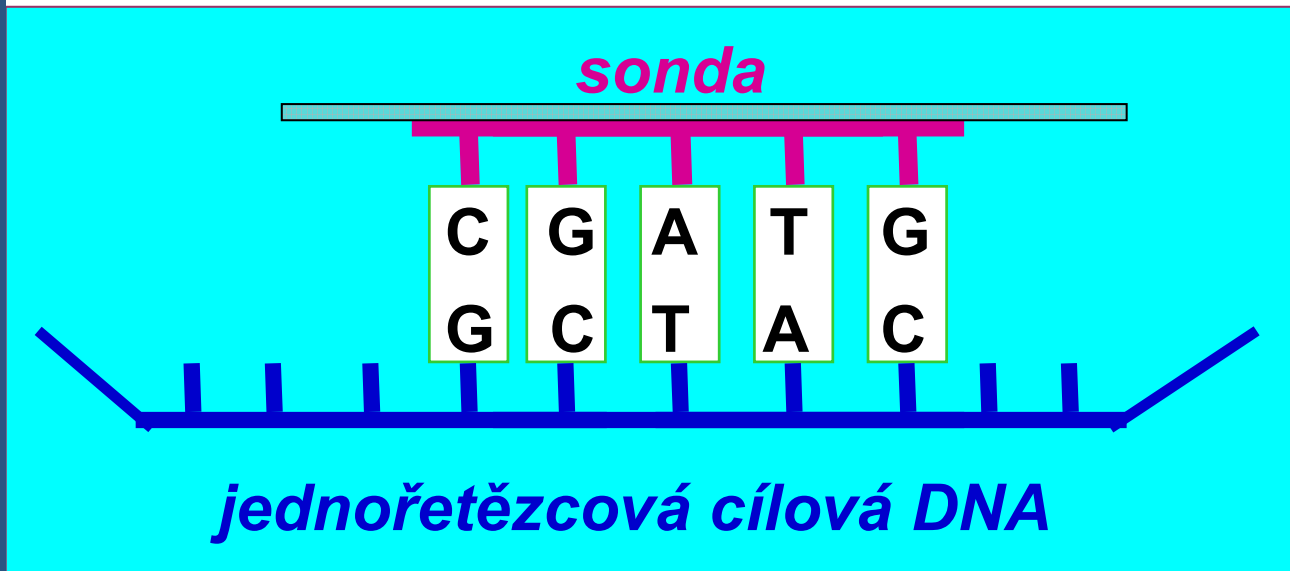




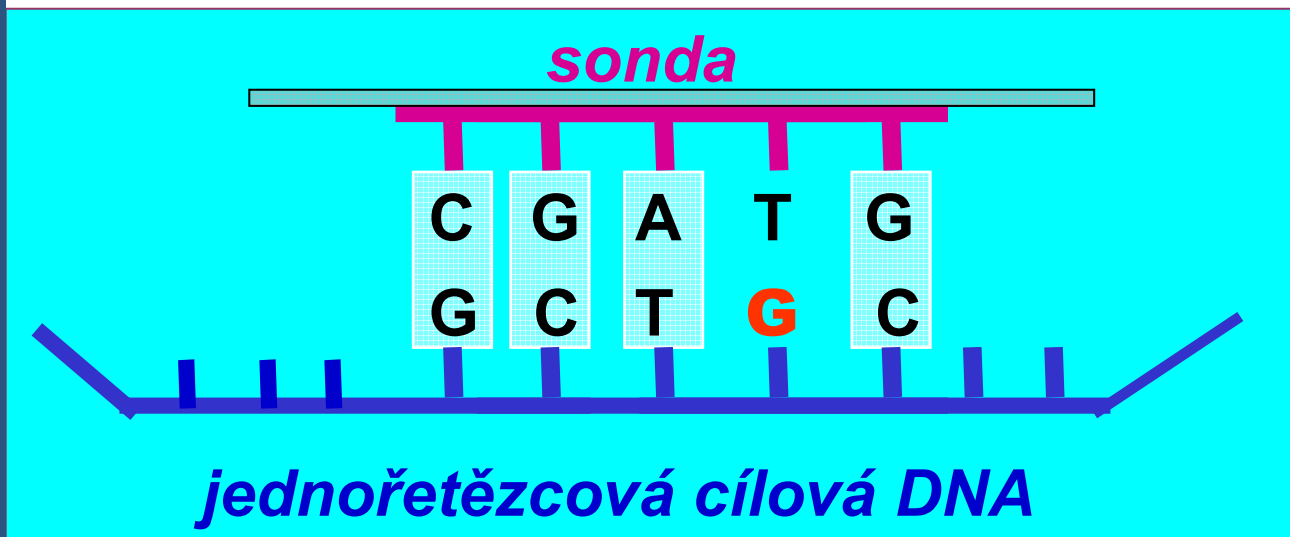
2. PCR – SSO (INNO – LiPA systém)

- ❖ využití lokus – specifických primerů (značené např. biotinem)
- ❖ amplifikuje se celá oblast kódovaná jedním lokusem (exon 2,3)
- ❖ specifické alely nebo skupiny alel jsou následně určeny reverzní hybridizací s oligonukleotidovými próbami (sondami)
- ❖ denaturace amplifikované DNA
- ❖ DNA próby (sondy) imobilizovány na nitrocelulóзовém stripu
- ❖ reverzní hybridizace denaturované DNA s DNA próbou na stripu
- ❖ vymytí nespecificky navázané DNA
- ❖ konjugát (streptavidin + alkalická fosfatáza)
- ❖ substrát, je štěpen fosfatázou a dojde k vytvoření barevného precipitátu
- ❖ odečtení pozic barevných precipitátů, vyhodnocení počítačovým programem

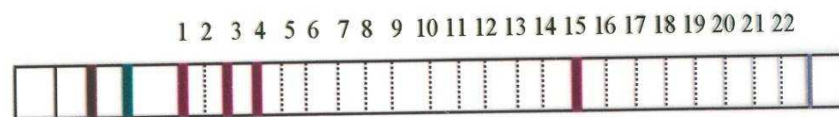
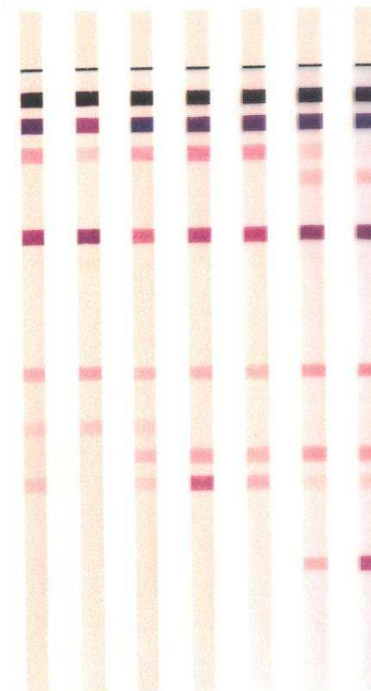
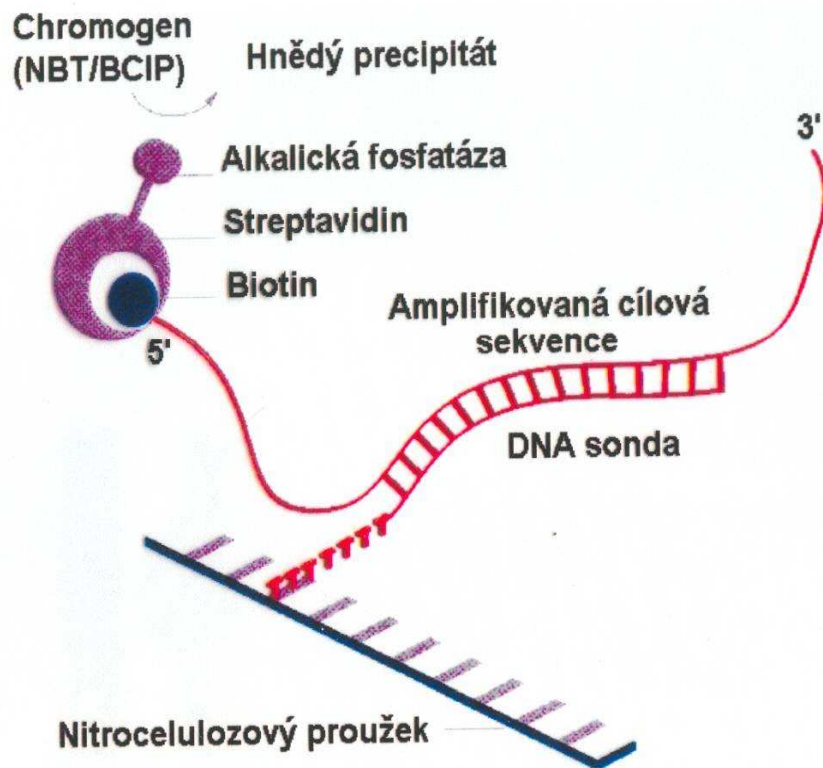
hybridizační reakce



perfektní shoda
HYBRIDIZACE



1 neshoda
ŽÁDNÁ
HYBRIDIZACE



DQB typizace: DQB1*0302 x DQB1*0401

3. PCR – SBT

- ❖ Použití ddNTPs (dideoxy nucleotide triphosphates, chybí 3'-OH skupina), které fungují jako terminátory PCR reakce
- ❖ ddNTPs značeny 4 různými fluorescenčními barvivy, PCR probíhá v 1 zkumavce a elfo v 1 linii
- ❖ sekvenátor – probíhá kapilární elektroforéza, produkty rozdělány podle velikosti (rozdíly v délce o 1 nukleotid), laserový paprsek snímá koncový fluorescenčně značený ddNTP
- ❖ interpretace výsledků pomocí softwaru

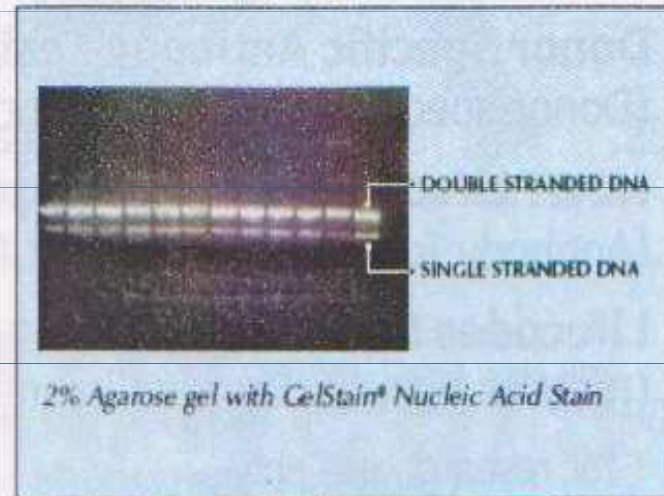
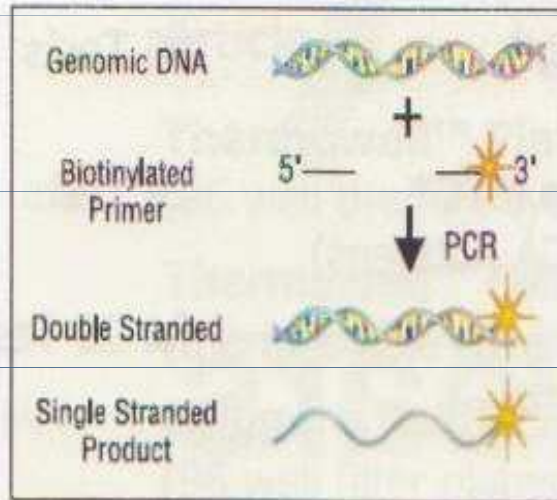
Dnes – NGS = sekvenování nové generace

4. Mikročipy

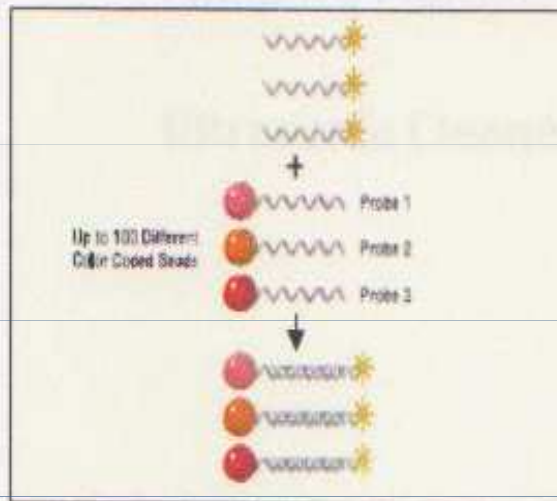
- ❖ miniaturizace systému
- ❖ na sklíčku naneseny stovky až tisíce oligonukleotidů
- ❖ plně automatizovaný systém
- ❖ kompletní HLA typizace na úrovni „high resolution“ během jedné analýzy

PCR-SSO typizace na analyzátoru Luminex

(for 100 typings)



1. Amplify with biotinylated primers



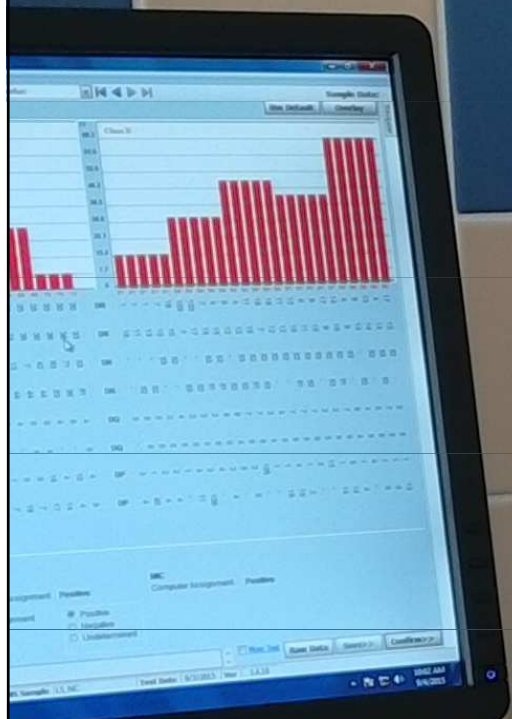
2. Hybridize with beads



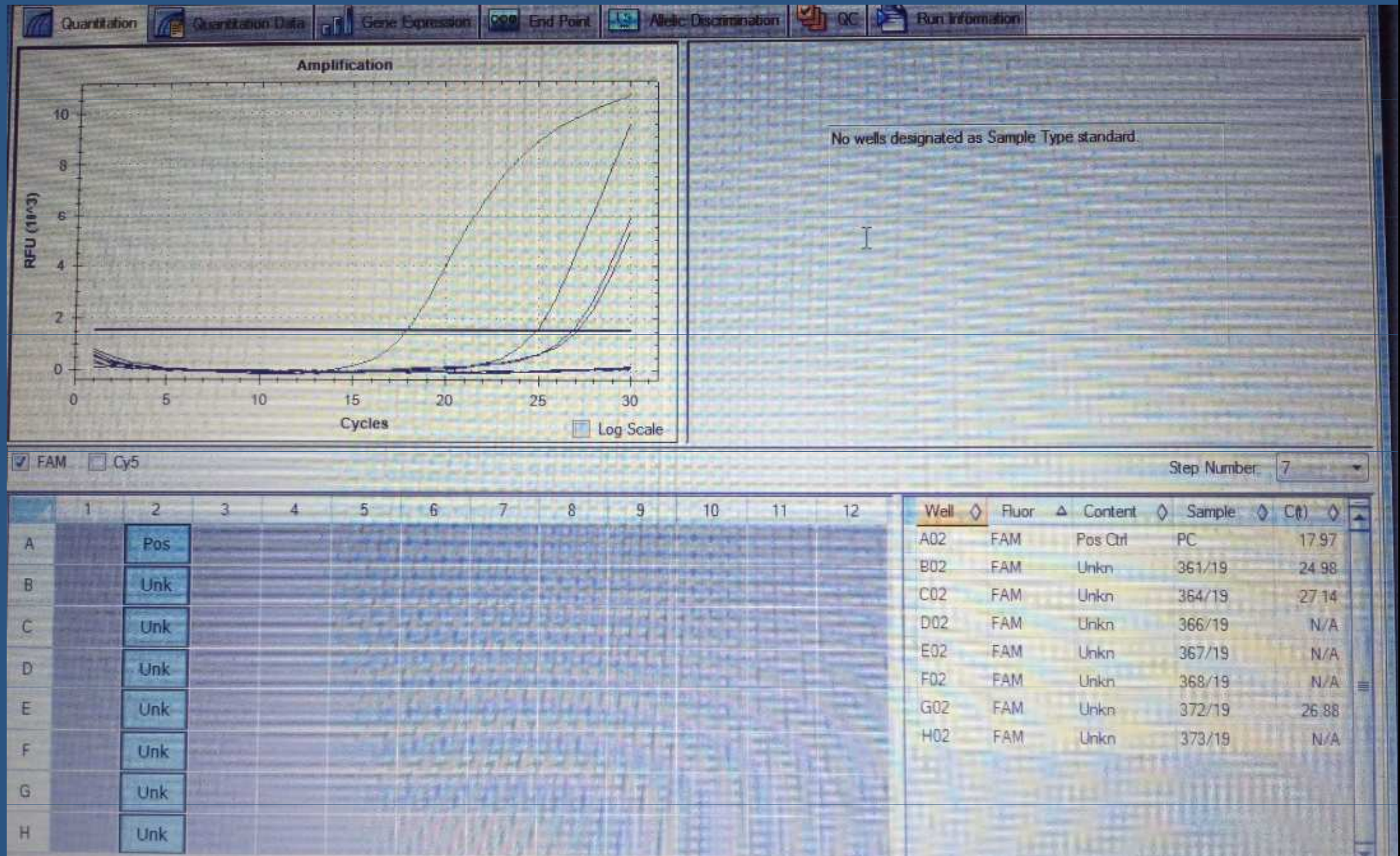
3. Label with SA-PE



4. Analyze in the fluoroanalyzer



Real-Time PCR



Děkuji za pozornost